

**CELL-TARGETED LYtic PORE-FORMING AGENTS****Publication number:** WO9425616 (A1)**Publication date:** 1994-11-10**Inventor(s):** BAYLEY HAGEN; WALKER BARBARA J +**Applicant(s):** WORCESTER FOUND EX BIOLOGY [US] +**Classification:**

- international: A61K35/66; A61K38/00; A61K39/44; A61K41/00; A61K45/00; A61K47/48; A61P35/00; A61P37/00; C07K14/31; C07K14/315; C07K16/18; C07K19/00; C12N15/62; C12P21/02; C12Q1/02; G01N33/50; G01N33/566; A61K35/66; A61K38/00; A61K39/44; A61K41/00; A61K45/00; A61K47/48; A61P35/00; A61P37/00; C07K14/195; C07K16/18; C07K19/00; C12N15/62; C12P21/02; C12Q1/02; G01N33/50; G01N33/566; (IPC1-7): A61K35/14; C07K15/28; C12P21/00; C12Q1/02

- European: A61K41/00; A61K47/48K4D; C07K14/31; C07K16/18; C12N15/62; G01N33/50D2

**Application number:** WO1994US04016 19940412**Priority number(s):** US19930054898 19930428**Also published as:**

- US5817771 (A)
- JP9500102 (T)
- EP0753071 (A1)
- CA2160909 (A1)

**Cited documents:**

- US4867973 (A)
- US4975278 (A)

**Abstract of WO 9425616 (A1)**

A chimeric compound that contains a cell-specific ligand linked to a pore-forming agent capable of lysing a cell.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

**JP9500102T**

Publication Title:

CELL-TARGETED LYtic PORE-FORMING AGENTS

Abstract:

Abstract not available for JP 9500102

(T) Abstract of corresponding document: WO 9425616

(A1) Translate this text A chimeric compound that contains a cell-specific ligand linked to a pore-forming agent capable of lysing a cell.

---

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-500102

(43)公表日 平成9年(1997)1月7日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 07K 19/00		8517-4H	C 07K 19/00
A 61K 35/66	ADU	7431-4C	A 61K 35/66
38/00	ABB	9284-4C	39/44
39/44		8415-4C	45/00
45/00		8517-4H	C 07K 14/31

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号	特願平6-524307
(86) (22)出願日	平成6年(1994)4月12日
(85)翻訳文提出日	平成7年(1995)10月30日
(86)国際出願番号	PCT/US94/04016
(87)国際公開番号	WO94/25616
(87)国際公開日	平成6年(1994)11月10日
(31)優先権主張番号	08/054, 898
(32)優先日	1993年4月28日
(33)優先権主張国	米国(US)
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71)出願人	ウォーセスター ファウンデーション フ ォー エクスペリメンタル バイオロジー
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 シ ュリュースバリー メイブル アヴェニュ ー 222
(72)発明者	バイレイ ハーゲン
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 グ ラフトン オーク ストリート 25
(72)発明者	ウォーカー パーバラ ジェイ.
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 オ ウバーン ウッドランド ロード 33
(74)代理人	弁理士 清水 初志

(54)【発明の名称】 細胞指向性溶解孔形成剤

(57)【要約】

細胞を溶解することができる孔形成剤に結合した細胞特  
異的リガンドを含むキメラ化合物。

## 【特許請求の範囲】

1.  $\alpha$ -ヘモリシン、エアロリシン、パーフリンゴリシン、ニューモリシン、ストレプトリシンO、リストリオリシン、バチラス チューリングエンシス毒素、大腸菌由来ヘモリシン、大腸菌由来コリシン、デフェンシン、マガイニン、メリチン、コンブルメント、パーフォリン、酵母キラートキシン、またはヒストリシンに結合した、細胞特異的リガンドを含有するキメラ化合物。
2. 一つまたは複数の孔により、細胞を溶解することのできる孔形成剤から構成される分子に結合した、細胞特異的リガンドを含有するキメラ化合物において、該孔形成剤は不活性型であり、該細胞表面の条件または物質により活性化されるものであるキメラ化合物。
3. 細胞表面の条件または物質により活性化される、不活性型孔形成剤。
4. リガンドが、抗体である、請求の範囲2の化合物。
5. 細胞表面の条件が、pH変化、還元電位、または金属イオン濃度である、請求の範囲2または3の化合物。
6. 細胞表面の条件が、熱または光である、請求の範囲2または3の化合物。
7. 細胞表面の物質が、細胞特異的なプロテアーゼ、エステラーゼ、グリコシダーゼ、エクトキナーゼ、または fosfataーゼである請求の範囲2または3の化合物。
8. (a)請求の範囲2または3の化合物、及び(b)薬剤学的に受容可能なキャリヤー中の化学療法剤を含有する組成物。
9. 孔形成剤が、ブドウ球菌の $\alpha$ -ヘモリシンである、請求の範囲2または3の化合物。
10. 孔形成剤が、 $\alpha$ -ヘモリシン、エアロリシン、パーフリンゴリシン、ニューモリシン、ストレプトリシンO、リストリオリシン、バチラス チューリングエンシス毒素、大腸菌由来ヘモリシン、大腸菌由来コリシン、デフェンシン、マガイニン、メリチン、コンブルメント、パーフォリン、酵母キラートキシン、ヒストリシンのいずれかである、請求の範囲2または3の化合物。
11. 溶解性をもたない化合物が、あらかじめ決められた細胞のタイプに特異的に関連のある物質または条件により、活性化されて、溶解性を有するようになる

ことができるか否かを決定するための方法において、以下のものを含む方法。

(a)該物質または条件の存在下及び非存在下両方において、培養細胞を化合物に接觸させる

(b)該化合物が活性化され得るということの指標として、細胞溶解を決定する。

12. 段階(a)の前において、溶解性をもたない化合物が、活性化するための物質または条件との相互作用に関係のある部位の組み合わせの変異により作成される、請求の範囲11の方法。

**【発明の詳細な説明】****細胞指向性溶解孔形成剤****発明の属する技術分野**

本発明は、孔形成化合物に関する。

**発明の背景**

膜を貫通するチャネル或いは孔は、ある細菌外毒素により形成される (Bhakdi et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 306:311-324, 1983)。ブドウ球菌 $\alpha$ 毒素( $\alpha$ HL)のような孔形成毒素は、細胞膜の脂質二重層に集合して超分子の両親媒性ポリマーを形成し、安定な膜貫通孔を形成する。

$\alpha$ HLは、33,200Daの単ポリペプチド鎖であり、黄色ブドウ球菌が分泌する水溶性の毒素である (Gray et al., Infect. Immun. 46:615, 1984)。 $\alpha$ HLは、細胞膜中に6量体構造を形成することにより、インピトロで赤血球を溶解することができる。

**発明の要約**

手術、放射線治療、化学療法の発展にもかかわらず、多くの癌に対して安全で効果的な治療は困難である。治療にとって特にやっかいなのは、手術や放射線治療の後に残る転移細胞である。それらの細胞は、従来の化学療法に対して耐性であることが多い。

本発明は、標的細胞の表面において活性化されるような孔形成化合物を供給することにより、この問題に対処するものである。限定された孔形成は、細胞膜を透過性とし、細胞毒性を有する化学療法剤あるいは核酸のような、通常は細胞の細胞質中に取り込むことが難しい物質の取り込みを増加させることができる。大量の孔形成は、それ自体、細胞の破壊を引き起こすことができる。

本発明の特徴は、各々が異なる機能をもつ二つの成分から構成されるキメラ化合物にある。キメラの一方の部分は、標的細胞表面の分子或いは構造に特異的に結合できる細胞特異的リガンドとなり得る輸送剤である。このリガンドは、ひとつまたは複数の孔を細胞膜の脂質二重層に形成し、細胞の溶解を引き起こす孔形成剤と結合している。

キメラの細胞特異的リガンドは、合成物または天然由来のものであり、抗原、成長因子レセプターまたは感染細胞表面に発現する細菌タンパクのような、標的細胞表面の特異的な分子または構造に結合する。リガンドとしては、抗体が好ましい。治療の目的には、細胞特異的リガンドまたは抗体を、例えば病理と関係のある細胞のような、体内的不要細胞に結合するものにすることができる。このような細胞には、腫瘍細胞に限らず、慢性的にウィルスに感染している細胞または免疫系細胞のように適切に制御または発現が行われないと病気の状態に陥るような細胞が含まれる。不要細胞には、遺伝子治療の結果として治療用の組換え核酸を発現した細胞もある。このような不要細胞の除去は、遺伝子治療の調節または中止の手段となり得る。

標的細胞に一つまたは複数の溶解孔を形成することのできる孔形成剤は、 $\alpha$ HL、エアロリシン (aerolysin)、バーフリンゴリシン (perfringolysin)、ニューモリシン (pneumolysin)、ストレプトリシンO (streptolysin O)、リスティオリシン (listeriolysin)、バチルス・チューリングensis (Bacillus thuringiensis) 毒素などの細菌外毒素、またはヘモリシン (hemolysin) やコリシン (colicin) のような大腸菌由来溶解性分子、またはデフェンシン (defensin)、マガイニン (magainin)、メリチン (mellitin)、コンプレメント (complement)、ペーフォリン (perforin)、酵母キラー毒素 (yeast killer toxin)、ヒストリシン (histolysin) のような真核細胞由来の剤が好ましいが、これに限定されない。

キメラ化合物の二つの構成成分は、非共有結合、または共有結合、またはその両方を介して結合している。その結合は、硫黄原子を含む共有結合が好ましく、ジスルフィド、チオエステル、チオエーテル結合がより好ましい。本発明の化合物は、キメラの二つの構成成分が、ペプチド結合で連結した組換えフュージョンタンパク質としても作成されうる。

不活性であるが、標的細胞表面の状態または物質により溶解性を持つ活性型に変換されるような変異孔形成剤、及びそのような活性化可能な剤が細胞特異的リガンドに結合したものからなるキメラ化合物もまた、本発明の特徴である。そのような分子は物理的、化学的、生化学的に活性化される。本発明の化合物を活性

化することのできる物理的条件には、熱や光があるがこれに限定されない。孔形成剤を活性化できる化学的条件には、pH変化、還元電位、金属イオン濃度がある。標的細胞と特異的な関係を持ち化合物を活性化できる生化学的物質には、プロテアーゼ、エステラーゼ、グリコシダーゼ、エクトキナーゼ、 fosfataーゼなどがあるが、これに限定されない。細胞表面のこれらの物質または条件には、内因的つまり腫瘍プロテアーゼのような標的細胞から分泌されるものと、外因的つまりランプやファイバーオプティクス装置から発せられる光のような標的細胞以外から供給されるものとがある。例えば、皮膚腫瘍に本発明の化合物または剤を局所適用し、光源にさらして活性化するという治療も可能である。

当発明化合物は、動物、好ましくはヒトに適用し、病理に関連のある不要細胞を破壊することに使用できる。単独の活性化可能な孔形成剤および本発明キメラ化合物はいずれも、治療用に薬剤学的に受容可能なキャリヤーに入れ、投与できる。動物体内の、または動物から摘出された不要細胞は、標的細胞に、本発明の化合物を単独で、または化学療法剤と共に接触させることにより破壊することができる。本発明の化合物及び化学療法剤は、同時または連続的に投与する。化学療法剤とは、細胞毒性を有する化合物または核酸と定義される。例えば、メクロレタミン、シクロfosfamid、ifosfamid、L-salicorin、クロラムブチル、ヘキサメチルメラミン、チオテバ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾチニン、ダカルバジン、メトレキサート、フルオロウラシル、シタラビン、メルカブトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、エトポシド、テニポシド、アクチノマイシンD、ダウノマイシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、アリカマイシン、マイトイマイシン、シスプラチン、ミトキサンtron、ヒドロキシ尿素、プロカルボジン、マイトタン、アミノグルテチミド、アレドニゾン、ヒドロキシプロゲステロン、ジエチルスチルベストロール、タモキシフェン、フルタミド、またはロイプロリド、及び細胞の重要な遺伝子と相補的であり、そのような遺伝子を除去、または発現を抑制することができるようなDNAオリゴヌクレオチド、及び細胞のタンパク合成を阻止できるリボザイムなどがある。

本発明の特徴は、標的細胞に関連のある条件または物質により活性化される能

力について、孔形成化合物をスクリーニングする方法にもある。候補化合物は、細胞特異的な条件または物質との相互作用に関する部位の組合せ突然変異により作成する。標的細胞を、細胞特異的条件または物質の存在下、非存在下で候補化合物と接触させて、その候補化合物が活性化可能であるということの指標として、細胞溶解を評価するのが好ましい。

#### 詳細な説明

まず、図を簡単に説明する。

#### 図

図1は、 $\alpha$  HLオーバーラップ変異体の、プロテアーゼ処理による溶血活性の活性化を示す一連のグラフである。共役したインビトロ転写／翻訳(IVTT)により作成した二本鎖 $\alpha$  HL相補変異体の構造の特徴を、左のパネルに示した。中央と右のパネルは、二倍希釈系列を用いた微量力値アッセイの結果を示している。プロテアーゼ未処理の変異体のアッセイは中央のグラフに、エンドプロテアーゼLys-C(endo C)処理済のサンプルのアッセイは右のグラフに示した。各窓において、棒の先端は1時間、3時間、24時間（左から右）後の、50%溶血したウェルを示している。各窓の先端はウェル12を、一番下はウェル「0」（「0」は、ウェル1において溶血がなかったことを示す。）を表す。縦軸の目盛りは、2の対数である。オーバーラップ変異体は、IVTT混合液(10  $\mu$ L)にエンドC(1.0  $\mu$ g)を添加することにより活性化する。ウェル1でのIVTTの最初の希釈は、1:4である。二本鎖変異体を作る個々のポリペプチドには、溶血活性はない。

図2は、分光光度法により決定した、選ばれた変異体の溶血を示す一連のグラフである。0.025%ウサギ赤血球(500  $\mu$ L)にIVTT混合液(10N  $\mu$ L、添加前)を添加した後の、600nmにおける光散乱の減少を、赤血球溶解の指標としてモニターした。用いた変異体は、図1に示すように、コントロールとして、活性化されないギャップ変異体 $\alpha$  HL(1-131)・(143-293)が付加されている（左下のパネル）。

図3は、オーバーラップ変異体及びその成分ポリペプチドの、エンドC処理されたタンパク分解フラグメントの、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)写真である。左のパネルは、エンドC未処理の個々の鎖を、

右のパネルは、エンドC(6 $\mu$ L IVTT混合液に、1 $\mu$ gを添加)処理済の個々の鎖を示している。

図4は、二本鎖変異体をエンドCで処理した結果を示す、SDS-PAGEゲルの写真である。左のパネルは、エンドC未処理の二本鎖変異体を、右のパネルは、エンドC(12 $\mu$ L IVTT混合液に、1 $\mu$ gを添加)処理済の二本鎖変異体を示している。二本鎖変異体は、ポリペプチド1-131及び132-293を含むフラグメントに変換される。これらのフラグメントは、それ以上分解されない。前述のオーバーラップをもつ変異体の場合には、全長 $\alpha$ HLポリペプチドも生成する。

図5は、タンパク分解データの図による説明である。順方向と逆方向両方のオーバーラップ変異体の、最終的な状態を囲った。

図6は、エンドC処理済のオーバーラップ変異体K8A(1-172)・(132-293)の、タンパク分解の時間経過を示すSDS-PAGEゲルの写真である（右）。タンパク分解により、1-131（黒塗り矢印）及び132-293（白抜き矢印）という2つの鎖が形成され、それ以上は分解されない。IVTT混合液(12.5 $\mu$ L)を1200Ci/mmolの( $^{35}$ S)メチオニンを使って作り、30°CでエンドC(1.0 $\mu$ g)で処理する。表示された時間の後、沈殿を除去し、1mM N-p-トシリ-L-リジンクロロメチルケトン(TLCK)で処理する。一本鎖K8Aのタンパク分解を、コントロールとして行った。（左）

図7は、Lys-131またはArg-131を含む $\alpha$ HL1-172・132-293オーバーラップ変異体の、選択的タンパク分解を示すグラフである。ウサギ赤血球の溶血は、ウサギ赤血球の懸濁液にIVTT混合液を添加した後の、600nmにおける光散乱の減少によりモニターした。左のパネルは、エンドCによる活性化の後の結果を、右のパネルは、クロストリパインによる活性化の後の結果を示している。

図8は、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>の存在化または非存在化における、 $\alpha$ HL-H5mによる溶血の、分光光度法を使ったアッセイの結果を示すグラフである。0.025%ウサギ赤血球(500 $\mu$ L)に精製 $\alpha$ HL-H5m(0.4mg/ml, 1.0 $\mu$ L)を添加した後の、600nmにおける光散乱の減少をモニターした。アッセイは、20mM K-リン酸、150mM NaCl(pH7.4)に0.025%に希釈したウサギ赤血球を使い、室温で行った。

図9は、プロテアーゼ感受性野性型 $\alpha$ HL変異からのプロテアーゼで活性化された $\alpha$ HL変異体の構造を示した図である。

図10は、不活性型の本発明のキメラ化合物の構造、及びそれが腫瘍特異的プロテアーゼにより活性型へと変換された後の構造を示す図である。

図11は、組合せライブラーから、細胞特異的物質により活性化される孔形成剤を、スクリーニングする方法を示した図である。

#### 本発明の化合物

上記の要約に記述したとおり、本発明の化合物には、以下に詳細に記載するいくつかの成分が用いられる。

本発明の化合物の第一の成分は溶解孔形成剤であり、それは天然に存在するものと合成により作られるものとがある。孔形成剤とは、細胞の脂質二重層に一つまたは複数の膜貫通孔を形成しその細胞を溶解させることができる、分子またはフラグメント、またはそのような分子の誘導体またはアナログである。そのような細菌に由来する孔形成剤には、 $\alpha$ -HL、大腸菌ヘモリシン、大腸菌コリシン、B. サーチュリングニス毒素、アエロリシン (aerolysin)、パフリンゴリシン (perfringolysin)、ニューモリシン (pneumolysin)、ストレプトリシン0 (streptolysin 0)、リストリオリシン (listeriolysin) 等がある。細胞を溶解することのできる真核生物由来の孔形成剤には、ディフェンシン (defensin)、マガイニン、メリチン (mellitin)、補体 (complement)、パーフォリン (perforin)、酵母キラートキシン (yeast killer toxin)、ヒストリシン (histolysin) 等がある。ペダーソン (Pederson) のクラウンエーテル及びバリノマイシンなどの合成有機分子も、細胞膜に溶解孔を形成することができ、使用可能である。その他の合成溶解孔形成剤は「Regen et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159:566-571, 1989」に記述されており、参照として本発明に含まれる。

本発明の化合物には、溶解活性を示す、天然または合成の孔形成剤のフラグメントも含まれる。本発明は、実際の全長ポリペプチドだけでなく、生化学的活性のあるポリペプチドフラグメントも提供する。孔形成ポリペプチドまたはフラグメントは、天然または合成の脂質二重層に一つまたは複数の溶解孔を形成することができるならば、生化学的に活性であるとする。

天然または合成の脂質二重層に孔を形成することができず、標的細胞の表面の物質または条件が働くことにより初めて溶解活性型へと変換されるような不活性

型孔形成剤もまた、本発明に含まれる。変異不活性型孔形成剤は、細胞特異的リガンドに結合したものだけでなく、単独でも本発明の範囲に含まれる。

溶解孔形成剤の生化学的活性フラグメントは、当業者に知られた方法、例えばタンパク分解または組換えペプチドの発現などにより作成される。候補フラグメントが細胞膜を透過性化する能力は、当業者に知られた方法、例えば前もって負荷した細胞からの、ATPまたは放射活性のレベルのような細胞内容物の放出により、または無傷の細胞には排除されるトリパンブルーのような色素の取り込みにより調べることができる。

ここで使っているように、「フラグメントまたはセグメント」という用語は、ポリペプチドについて用いる場合、最低5個の連続したアミノ酸のことをいう。本発明において、フラグメント長は、アミノ酸の数が最低10個が典型的、最低20個ならより典型的、最低30個が一般的で、最低40個が望ましく、最低50個ならより望ましく、最低60個から80個またはそれ以上がもっとも望ましい。

本発明は、細胞を溶解することのできる天然孔形成剤のアナログも含んでいる。アナログの天然孔形成剤との相違には、アミノ酸配列の違い、またはアミノ酸配列には影響のない修飾、またはその両方がある。

(通常は一次配列を変化させない)修飾には、インビボまたはインビトロの、アセチル化またはカルボキシル化等の、ポリペプチドの化学的誘導がある。また、ポリペプチドの合成及びプロセシングの間、またはその後のプロセシングにおけるグリコシル化パターンの修飾などの、グリコシル化の修飾も含まれる。その方法は、例えば、哺乳類のグリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素などの、グリコシル化に影響を与える酵素にポリペプチドをさらすことによる。さらに、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、リン酸化スレオニンなどのリン酸化アミノ酸残基を含むペプチド、または脂肪酸修飾を受けたペプチドも含まれる。

本発明はまた、一つまたは複数のペプチド結合を、ペプチダーゼによる分解を受けない別のタイプの結合(以下「擬ペプチド」と称する)に置換したものも含む。患者への投与後の蛋白分解が問題になる場合は、特に感受性の高いペプチド結合を非分解性の擬ペプチドに置換することにより、より安定なペプチドとなり、そしてほとんどの場合薬剤の有用性が増す。このような擬ペプチド、またはそ

れ

をポリペプチドに導入する方法は当業者によく知られている。同様に、L-アミノ酸残基の置換も、ポリペプチドのタンパク分解に対する感受性を低下させる標準的な方法である。また、t-ブチロキシカルボニル、アセチル、セイル、スクシニル、メトキシスクシニル、スペリル、アジビル、アゼライル、ダンシル、ベンジロキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル、メトキシアゼライル、メトキシアジビル、メトキシスペニル、2,4-ジニトロフェニルなどのアミノ末端保護基も有用である。ほとんどの修飾は、タンパク質をよりタンパク分解抵抗性にするために行われるが、標的細胞に結合しなかった遊離の化合物を迅速に除去し、治療の副作用を最低限にする目的で、そのような分解を強める修飾も本発明に含まれる。

以前の免疫、感染、または毒素から作られた薬剤の処置により、患者に細菌毒素に対する抗体が存在することもあるため、モノメトキシポリエチレングリコール(mPEG) (Sehon et al., Int. Arch. of Allergy and Immunol. 94:11-20, 1991) とのカップリングなどにより、化合物を非抗原性にするような修飾も含まれる。

本発明には、細胞に関連した物質または条件により特異的に活性化されるようないし、不活性型孔形成剤を作るための修飾も含まれる。そのような修飾には、酵素分解部位を含むペプチドの付加がある。例えば、リジンまたはアルギニンのペプチド結合は、酵素トリプシンで加水分解される。化学反応基または光化学反応基の付加のようなその他の修飾もまた、本発明に含まれる。また、ヒスチジン、システイン、またはpKa値、安定性の変化した1,2,3,トリアゾール-3-アラニン及び2-メチルヒスチジンなどの非天然アミノ酸の付加などにより金属結合部位を付加すること、及びN原子の配置変更により金属結合性を変化させることも本発明に含まれる。

また、溶解性を有効に活用できるように、または細胞関連物質による活性化を伝達できるようにするための修飾を受けたペプチドも含まれる。アナログは、天然の剤とは一次のアミノ酸配列が違っているかもしれない。これらのペプチドには、遺伝学的に異なる、天然体と誘導体の両方が含まれる。誘導変異体は様々な

方法により作られる。例えば、放射線やエチルメタンスルホン酸(EMS)を使った、核酸のコード部分のランダム突然変異、または部位特異的突然変異、またはボリ

メラーゼチェーン反応(PCR)のようなその他の分子生物学的手法が用いられる。また、D-アミノ酸、 $\beta$ または $\alpha$ アミノ酸などの非天然または合成のアミノ酸、非天然の側鎖をもつL-アミノ酸(Noren et al., Science 244:182-188, 1989/参照として本発明に含まれる。)などの、天然L-アミノ酸以外の残基を含むアナログも含まれる。タンパク質のタンパク骨格に非天然アミノ酸を部位特異的に組み込む方法は、「Ellman et al., Science 255:197, 1992」に記述されており、本発明に含まれる。本発明のペプチドは、ここに特別に例として挙げられたプロセスのいずれの生成物にも限定されない。

有用な変異体は、本発明スクリーニング法を使って同定できる。それは、セミランダムな突然変異カセットを含む、組み合わせライブラリーを、活性の有無、または条件または物質により活性化されるかどうかでスクリーニングするものである。

#### 細胞特異的リガンド

化合物の輸送部分または細胞特異的リガンドは、標的細胞に特異的に結合するリガンドであればどのようなものでもよい。本発明では、完全なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体だけでなく、Fab'または(Fab')<sub>2</sub>フラグメント、遺伝子工学により作成されるFvフラグメント(Ladner et al., U.S.Patent No.4,946,788)のような、免疫学的活性を有する抗体フラグメントも使うことができる。

輸送剤には、その他の細胞特異的リガンドも含まれる。例えば、ステロイドホルモン、ペプチドホルモンのようなホルモン；オピオイドペプチドなどの神経活性物質；インスリン；上皮細胞成長因子、インスリン様成長因子、纖維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、腫瘍壞死因子などの成長因子；インターロイキン(IL)、例えばIL-2、IL-4、IL-5、などのサイトカイン；メラノサイト刺激ホルモン；例えば、HIV感染細胞表面に発現するタンパク質gp120に、特異的に結合する

可溶性CD4フラグメントのように、癌細胞、細菌感染細胞、免疫系細胞例えはB細胞、T細胞、そのサブセットのような、特異的なクラスの細胞（あるいはウィルス）に親和性を有する物質またはレセプター、；レクチン、例えはあるサブセット糖タンパクに結合するコンカナバリンAのような、あるクラスの分子に親和性を有する物質、などがある。T細胞表面に発現するCD2、CD4、CD8、またはセレクチン、イン

テグリンの様な、hematopoetic由来の細胞に発現する分子、それから非免疫系細胞に発現する接着分子などの接着分子も、本発明の化合物を標的細胞に指向させるための輸送剤として使用可能かもしれない。いくつかの癌細胞では、ある接着分子を異常に発現するので、そのような接着分子に対するレセプターも輸送剤として使用可能かもしれない。

#### 溶解孔形成剤の細胞特異的リガンドとの結合

本発明の化合物の二つの機能成分は、共有結合または非共有結合またはその両方を介して一つに結合している。非共有結合には、ロイシンジッパーまたは抗体-Gタンパクの相互作用 (Derrick et al., Nature 359:752, 1992)に関する相互作用のように、イオン性、疎水性、親水性のものがある。

共有結合には、ジスルフィド結合がある。成分の一方をコードするDNAには、遺伝子工学により、特別なシステインコドンを含ませることができる。二つ目の成分には、一つ目の成分のシステインと反応することのできるメルカプト基を導入できる。メルカプト基は、そのものまたはシステイン残基の一部分として、固層ペプチド法により導入できる。例えば、メルカプト基のペプチドへの導入は、Hiskeyにより記述されている (Peptides 3:137, 1981)。

タンパク質を、標準的な技術により化学的に修飾して、メルカプト基を導入することができる。例えば、Traut試薬(2-イミノチオレイン塩酸)(Pierce Chemicals, Rockford, IL)を使うと、リジン残基やN末端のアミンの様な第一アミンにメルカプト基を導入できる。Traut試薬により修飾を受けたタンパク質またはペプチドは、N-スクシニミジル 3-(2-ビリジルジチオ)プロピオン酸(SPDP)またはスクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレイト(

SMCC)(Pierce Chemicals,Rockford,IL)のような試薬の修飾を受けたタンパク質またはペプチドと反応できる。

抗体の未反応メルカプト基は、当業者に知られた方法を使って作成される。例えば、抗体をペプシンで酵素分解すると $(Fab')_2$ フラグメントが得られ、次にジチオスレイトール(DTT)または2-メルカプトエタノールで緩和に還元すると、未反応メルカプト基を含むFab'フラグメントが得られる。一本鎖Fvなどの抗体フラグメントも、当業者に知られた方法を使って、末端にシステインを含むように組換え

遺伝子工学的に発現させるか、または上述のように化学的に修飾することができる。

化合物の各成分に、正しいメルカプト基を作った後、その二つの成分を精製し、各々の硫黄基を還元し；その成分を混合し；ジスルフィド結合形成を室温において完全に進行させる。カップリング反応の収率を改善するため、反応混合液に加える前に、成分の一方、例えばシステイン- $\alpha$ HLなどのシステイン残基を5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)または2,2'-ジチオビリジンにより、当業者に知られた方法で活性化させることもできる。反応後、反応液をリン酸緩衝生理的食塩水に対して透析し、結合していない分子を除去する。セファデックスクロマトグラフィーまたはそれに類似したものを行い、サイズにより、本発明の化合物をその構成部分から分離する。

キメラの化合物は、参照として本発明に含まれる「Maiti et al. Int.J.Cancer Suppl.3:17-22,1988」に述べられているように、ポリマー、モノメトキシポリエチレンリコール(mPEG)を使って結合させることもできる。

本発明の化合物を融合遺伝子の発現により作るのなら、ペプチド結合が孔形成剤と細胞特異的リガンドを連結する橋渡しをする。例えば、抗体の一本鎖Fvフラグメントと孔形成剤との組換えフュージョンタンパクは、当業者に知られた方法(Huston et al., Meth. Enzymol. 203:46-88, 1991／参考として本発明に含まれる)に従って作られる。

#### 活性化の条件または物質

本発明の不活性型化合物は、標的細胞表面において、ある条件または物質により活性化される。これらの条件または物質は、細胞自体から内因的に、または標的細胞以外の源から外因的に供給される。物理的、化学的、または生化学的な条件が、溶解活性を活性化しうる。このような条件は、キメラ化合物成分の一方または両方のコンフォメーション変化を引き起こすことにより、本化合物を活性化する。標的細胞表面における、熱や光のような物理的条件は、本発明の化合物の活性化に使用できる。温度上昇またはpH変化は、正常細胞と比較するとある腫瘍細胞に関連が深いので、熱感受性またはpH感受性の成分もそのような細胞による活性化に使用できる。また別の例として、光により活性化され得る本発明の化合

物は、UV放射体外装置からの光に血液を一時的にさらすことにより不要白血球を血液から除去するのに特に有用である。皮膚癌のように接近しやすい腫瘍についても、このやり方で治療できる。そして、肺癌のように比較的接近しにくい腫瘍は、ファイバーオプティクス装置からの光放射により到達できる。

pH、還元電位または金属イオンの存在などの化学的条件もまた、活性化要因として使える。例えば、本発明の化合物は、標的細胞表面の化学的条件により変化または除去され、その結果溶解活性が活性化されるような保護基を含むように修飾することができる。転移癌細胞は、マトリクスマタロプロテイナーゼ (Liotta et al., Cell 64:327-336, 1991) を分泌することが示されているので、マタロプロテイナーゼ認識部位を本発明の化合物に組み込めば、腫瘍細胞表面における酵素の作用を受け、孔形成剤機能が活性化されるということも可能である。また別の例では、金属イオンまたはエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)のような金属キレート剤を、動物の全身に、または標的細胞部位に直接注入し、溶解能を活性化または不活性化させることができる。

溶解孔形成活性は、生化学的にも活性化できる。プロテアーゼ、エステラーゼ、グリコシダーゼ、エクトキナーゼ、フォスファターゼなどの酵素のような、不要細胞から分泌される、または関連のある、どのような物質も、標的細胞表面で本発明の化合物に作用し、孔形成機能を活性化できるのであれば使用可能である。

治療のための投与

本発明の化合物は、癌あるいはあるクラスの不要細胞の存在により特徴づけられるようなその他の医学的疾患に苦しむ、ヒトなどの動物に投与することができ。例えば、HIV感染患者のCD8をもつT細胞を治療的に破壊することは、そのような患者のCD4とCD8の比率を適切に保つことに有効かもしれない (Rennie, Sci.Amer. 5/93:24-24)。

化合物の投与量は、疾患の種類、その疾患の程度、疾患に苦しむ動物の大きさなどにより変化する。一般的にその投与量は、癌治療に用いられる他の細胞毒性剤と同じ範囲にあるが、化合物の特異性が増したためにより少ない量が要求されるような物質もある。本発明の化合物は、上記の化学療法剤などの標的細胞に進入しにくい薬剤と、同時または連続的に投与する併用療法にも使える。例えば、

オリゴマーランチセンスDNAは、細胞の生存に必要な遺伝子の発現を除去または抑制することに使える。本発明の化合物による標的細胞の透過性化は、タンパク合成を阻止することにより細胞を死滅させることのできるリボサイムの進入も促進できる。

本発明の化合物の投与方法は、静脈注射が一般的であるが、皮下注射、または腫瘍部位などの、不要細胞が破壊される部位への直接注射も可能である。肺癌の治療には、化合物を吸入させ気管支を経由して腫瘍部位まで送ることもできる。皮膚癌のような原発癌細胞を破壊させるには、クリーム処方のような局所適用も使える。そして、転移細胞には、注射または移植を介した全身適用が適している。本発明の化合物は、動物またはヒトに適用するに当たって、無毒で薬剤学的に受容可能なキャリヤーに結合させることができる。

細胞特異的リガンドに結合していない、本発明の変異不活性型孔形成剤も上記のように投与することができる。この場合、孔形成剤の特異性は、標的細胞表面の活性化の条件または物質により決定される。例えば、転移癌細胞により作られる腫瘍特異的プロテアーゼは、不活性型孔形成剤の溶解機能を活性化することができるので、それにより、その活性化物質を生産しない細胞を破壊することなく、癌細胞の破壊を導くことができる。

実施例1：プロテアーゼにより活性化される $\alpha$ HL

これより、プロテアーゼにより特異的に活性化され得る、遺伝子工学的に製造された溶解孔形成剤について述べる。

 $\alpha$ HL変異体

$\alpha$ HLの変異体は、プラスミドpT7-NPH8Sから作成された。このプラスミドは、黄色ブドウ球菌より分泌されるような $\alpha$ HLの野生型配列をコードしている。pT7-NPH8Sは、初期PCRの間に起こったSer-217→Aspという変異を修正するようなオリゴスクレオチド指定突然変異を用いてpT7-NPH8 (Walker et al., J.Biol.Chem. 268:21782, 1992／参照として本発明に含まれる。)より作成された。pT7-NPH8中のコドンLys-8はオリゴスクレオチド指定突然変異によりAlaに変化し、無用なプロテアーゼ認識部位が除去された。

短縮 $\alpha$ HL遺伝子は、K8A遺伝子から、「Walker et al., 前出」の方法を使ってP

CRにより作成された。オーバーラップ変異体K8A,K131R(1-172/132-293)を得るために、K8A,K131Rをオリゴスクレオチド指定突然変異によりK8Aから作成し、それからK8A,K131R(1-172/132-293)をPCRによりK8A, K131Rから作成した。

共役IVTT

全長 (Walker et al., J.Biol.Chem. 267:10902-10909, 1992／参照として本発明に含まれる)、短縮 $\alpha$ HLポリペプチド (Walker et al., J.Biol.Chem. 267:21782-21786, 1992／参照として本発明に含まれる。)、及び二本鎖 $\alpha$ HLポリペプチド (Walker et al., J.Biol.Chem. 268:5285-5292／参照として本発明に含まれる)を、大腸菌S30抽出物(Promega No.L4500)を使うことにより、当業者に知られた方法に従ってIVTTにより作成した。混合液に、T7 RNAポリメラーゼ(NEB No.251L, 2000U/mLを添加)及びリファンビシン(20 $\mu$ g/mL)及び( $^{35}$ S)メチオニンを加えた。溶血アッセイにおいては、IVTT混合液中のメチオニン最終濃度を0.5mM(0.8Ci/mmol)にし、変異ポリペプチドの合成が10-50 $\mu$ g/mLの範囲の濃度で行われるようにした。合成は、37°Cで60分間行った。転写産物の総濃度と相対濃度は、SDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより測定した。

当業者に知られた方法を使って、細菌、酵母、またはその他の真核細胞で組換えタンパクを発現させるのは、大スケールの化合物生産に適している。

#### 溶血活性

微量力値ウェルで溶血アッセイをするために、エンドC未処理または処理済みのIVTT抽出物を、ウェル1で、1mg/mLウシ血清アルブミン(K-PBSA)を含む20mM K-リン酸、150mM NaCl, pH7.4で4倍希釈し(プロテアーゼ等の添加前の混合液量に基づく)、それからK-PBSAの二倍希釈系列を用いた。洗浄したウサギ赤血球を0.5%加え、プレートを20°Cでインキュベートした。K-PBSA(500μL)で0.025%に希釈したウサギ赤血球にIVTT混合物(10μL)を加えた後の、室温(25°C)における600nmの光散乱の減少により、分光光度法で溶血をモニターした。

#### タンパク分解

IVTT混合液(10μl)に、エンドC(Promega No.V544A:25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, pH 7.5中に1μg/1μl)を加えることによりオーバーラップ変異体を活性化した。30°C

で、10分後、TLCK(1mM)によりプロテアーゼを不活性化した。クロストリバイン処理のため、2.5mM DTTを含む50mM Tris-HClで活性化をした酵素(Sigma No.C-7403 0.1g)と共に、IVTT混合物(10μl)を30°Cで15分間インキュベートした。クロストリバインも、1mM TLCKで不活性化される。

電気泳動用サンプルを、1Xロード用緩衝液に溶解し、95°Cで2分間加熱し、12% SDSポリアクリルアミドゲル(U.K.Laemmli, Nature 227:680, 1970)の電気泳動にかけた。放射標識をしたマーカー(Gibco BRL)は、(<sup>14</sup>C)メチル化タンパク；ミオシン重鎖(Mr=200,000)；ホスホリラーゼb(Mr=97,400)；ウシ血清アルブミン(Mr=68,000)；オボアルブミン(Mr=43,000)；炭酸デヒドラターゼ(Mr=29,000)；β-ラクトグロブリン(Mr=18,400)；リゾチーム(Mr=14,300)である。

#### 六量体形成

IVTTは、(<sup>35</sup>S)メチオニン(1200Ci/nmol)存在下で行い、反応は、ウサギ赤血球細胞膜タンパクへの<sup>35</sup>Sの取り込みを阻害する、クロラムフェニコール(100 μM)と非標識メチオニン(5mM)を添加することによって停止させた。エンドC(1μg)未

処理、処理済のIVTT混合液(5μL)を、10%ウサギ赤血球(50μL)と共にK-PBSA中、20°Cで60分間インキュベートした。細胞または膜を遠心分離により集め、30μLの1Xロード用緩衝液(U.K.Laemmli, Nature 227:680, 1970)に溶解して、45°Cで5分間加熱し、12%SDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動にかけた。

#### α HL変異体の同定

溶解孔形成毒素であるブドウ球菌の $\alpha$ 溶血素は、リモデルされて、野生型タンパク質を不活性化する、Lys/Arg指定プロテアーゼにより活性化され得る不活性型分子となる。中央のグリシンリッチループ(Walker et al., 前出)の中央付近にニックの入った野生型 $\alpha$ HLペプチドは、ドメインードメイン相互作用により集まっており、溶血活性をもつ。対照的に、中央ループでオーバーラップしている二つの $\alpha$ HL短縮変異体からなる変異 $\alpha$ HLタンパク質(オーバーラップ変異体)は、孔形成活性は無いかまたは大きく減少している。オーバーラップ変異体は、ループの余分なアミノ酸がプロテアーゼにより除去されたとき、活性化されるよう設計されている。

トリプシンは、中央ループの中央付近のLys-131の後で、 $\alpha$ HLを切断する(Walker et al., 前出)。しかし、野生型 $\alpha$ HLは、Lys-8の後の二つ目の部位における切断が原因で、トリプシンにより不活性化される。Lys-8をアラニンと置換した変異 $\alpha$ HL K8Aは、野生型 $\alpha$ HLと同じ溶血活性をもつが、トリプシンやその関連プロテアーゼに抵抗性がある。

いくつかのオーバーラップ変異体は、各々短縮 $\alpha$ HL遺伝子を含む二つのプラスミドの転写産物の、インビトロ共翻訳によりK8Aから作成された。すべての場合に、トリプシン分解により、強い溶血活性をもつ1-131及び132-293というフラグメントの組み合わせが得られた。溶血アッセイによると、未処理オーバーラップ変異体の活性は弱いかまたは無いが、リジン及びアルギニン指定トリプシン、またはリジン指定エンドCにより活性化された(図1、図2)。

#### タンパク分解による活性化の機構

オーバーラップ変異体及びその由来の単ポリペプチド鎖は、エンドCにより分解される。 $\alpha$ HLの大きなN末端またはC末端フラグメントを含む单鎖は、急速に小

さいペプチドに消化される（図3）。対照的に、オーバーラップ変異体に組込まれている場合は、同じ鎖がフラグメント1-131及び132-293に変換され、それはプロテアーゼ抵抗性である（図4）。前述のオーバーラップ変異体(1-142・132-293及び1-172・132-293:N末端ポリペプチドに付加したアミノ酸)から作られた全長ポリペプチドは、更にエンドCにさらすことにより131-132の部位で切断されるため、融合部位に正常なペプチド結合を含むことができる（図5、図6）。

#### 選択的活性化

プロテアーゼ特異性の必要性は、中央のループの認識配列を変化させることによりテストした。二つのオーバーラップ変異体、1-142・132-293及び1-172・132-293を二つの点突然変異体K8A,K131Rより作成し、K8Aから作成した同じオーバーラップ変異体と比較した。Lys-131を含む変異体は、リジン指定エンドCにより選択的に活性化され、Arg-131変異体は、アルギニン指定クロストリパインにより選択的に活性化された（図7）。

#### 実施例2：金属反応性溶解孔形成剤

これより、金属イオンに反応する変異 $\alpha$ HLについて述べる。

#### 金属イオン感受性

金属感受性 $\alpha$ HLは、グリシンリッチループ内の残基130-134を、5個の連続ヒスチジンに置換することにより作られる。この変異体を $\alpha$ HL-H5mと記述する。 $\alpha$ HL-H5mの溶血活性は、図8に示したように、Zn<sup>2+</sup>(10μM)により不活性化され、EDTA(2mM)により賦活化される。対照的に、野生型 $\alpha$ HLは、同条件下でZn<sup>2+</sup>の影響を受けない。このような金属反応性剤は、患者への投与前には金属により不活性化し、低レベルのキレート剤、EDTAなどを投与して体内で活性化させるということが可能である。

金属イオンの存在により活性化されるような溶解孔形成剤もまた用いられる。 $\alpha$ HLに金属イオン感受性を与えるため、修飾、及びシステインや前述の非天然アミノ酸のような他の金属結合アミノ酸の導入を行うこともできる。2価グループI IB及び遷移金属(Co Ni またはCu)のような他の金属により活性化または不活性化される変異体は、以下に述べるような本発明スクリーニング法を用いることによ

り同定できる。

#### 実施例3； $\alpha$ HL抗体の製造

これより、遺伝子工学的に製造された、標的細胞特異的抗体に結合した不活性型変異 $\alpha$  HLについて述べる。

#### 抗体- $\alpha$ HL結合体の製造

特定の細胞タイプに特異的な関係を持つプロテアーゼはどれも、不活性型の本発明の化合物の活性化剤として使える。例えば、プラスミノーゲンアクチベーター、特にウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター(uPA)は、癌細胞の転移フェノタイプと特異的な関係がある(Liotta et al. Cell 64:327-336, 1991)。プラスミノーゲンアクチベーター認識配列Gly-Arg、またはuPA認識配列である、Gly-Argに負に帯電したアミノ酸が続く配列は、孔形成剤を特異的に活性化するために本発明の化合物に組込むことができる。同様に、ヒトコラゲナーゼIV(CIV)(Stetler-Stevenson et al., J. Biol. Chem. 264:1353-1356, 1989／参照として本発明に含まれる)の自己触媒切断部位も、化合物に組み込むことができる。これらの認識部位は、以下に述べるような、新規の孔形成剤の形成に用いられるセミランダム組み合せ突然変異カセットの基本としても役立つ。

変異二本差 $\alpha$  HLは、図9に示したように作成される。図の構造には、トリプシ

ンによるプロテアーゼ部位も加えた。マウスB16メラノーマ細胞は、プラスミノーゲンアクチベーター及びコラゲナーゼIVを分泌することが示されているので(Reish et al. Res. 48:3307-3312, 1988; Wang et al., Cancer Res. 40:288-292, 1980)、この細胞タイプによる特異的活性化のために、プラスミノーゲンアクチベーター及びコラゲナーゼIV(ゼラチナーゼ/MMP2)によるプロテアーゼ切断部位(Stack et al., Arch. Biochem. Biophys. 287:240-249, 1991; Stack et al. J. Biol. Chem. 264:4277-4281, 1989; Harrison et al. Anal. Biochem. 180:110-113, 1989)を加えることも可能である。連結領域は、グリシンまたはセリンリッチペプチドにすることができる。

遺伝子工学によりシステインを組込んだ、FabフラグメントまたはFvフラグメントもまた、図10に示したように、活性化された単一システイン、二本差 $\alpha$  HL変

異体に結合させることができる。FvフラグメントをコードするDNAは、抗ジニトロフェニル(DNP)抗体または抗B16抗体の場合と同様に(Chaudhary et al. Acad. Sci. USA 87:1066-1070, 1990)、抗体産生ハイブリドーマから抽出したRNAのRT-PCRにより作ることができる。キメラ化合物のインビトロスクリーニングには、IVT Tにより充分な二本鎖化合物が得られるので、遺伝子融合法が適している。二本鎖構造は、二つのプロモーターをもつ單一プラスミドまたは二つのシストロンのオペロンをもつ單一プラスミドという、二つの異なるプラスミドを使って細菌で発現させることができる。しかし大スケール生産には、各々の成分を別々に作り、それから上記のような化学的結合法を使って抗体またはその他の輸送剤を結合させるのが適している。

#### インビトロの結合体のテスト

(i) トリプシンによる活性化： トリプシンにより活性化した、 $\alpha$ HLオーバーラップ変異体を図9に示した。プロテアーゼを阻害し、溶血力価により活性化をアッセイしたところ、このような変異体またはこのような変異体を含むキメラ化合物は、インビトロで、プロテアーゼ、トリプシン(トリプシン部位はKで示した)で処理することにより活性化された。

(ii) 腫瘍プロテアーゼによる活性化： B16-F10メラノーマ細胞(B16)(ATCC Accession No.CRL6475)もまた、標的細胞として使える。これらの高度転移細胞は

プラスミノーゲンアクチベーター及びコラゲナーゼIVを分泌する(Reish et al., 前出; Wang et al., 前出)。適宜、プラスミノーゲンアクチベーター及びコラゲナーゼIV及びそのような酵素を作る細胞からの分泌物を使って、抗体-PA- $\alpha$ HL( PAは、酵素プラスミノーゲンアクチベーターの認識配列を意味する。)及び抗体-CIV- $\alpha$ HL(CIVは、酵素コラゲナーゼIVの認識配列を意味する。)を活性化することにより、インビトロで標的細胞を溶解させることができる。

#### 標的細胞表面における活性化

(i) 標的細胞；DNP ヒト赤血球： 活性野生型 $\alpha$ HLは $\alpha$ HLレセプターをもつウサギ赤血球を効率よく溶解するが、 $\alpha$ HLレセプターをもたない、ヒト赤血球やそ

の他の細胞は溶解しない。 $\alpha$  HLによる溶解に抵抗性のあるヒト赤血球を、溶解感受性にするためには、まずその表面をフッ化ジニトロフェノール(DNP-F)で修飾しなければならない。修飾された細胞は、それから抗DNP-K- $\alpha$  HLで処理し、洗浄し、それからトリプシンと共にインキュベートする。この例においては、抗DNP抗体は、修飾された標的細胞に化合物を指向させ、結果として孔の形成を引き起こす細胞表面 $\alpha$  HLポリペプチドの局所濃度を高める。

(ii) DNP-B16メラノーマ細胞： B16メラノーマ細胞も、DNP-Fで修飾し、それから抗DNP-PA-aHLまたは抗DNP-CIV- $\alpha$  HLにより処理する。この場合、化合物が標的細胞を透過性にする能力の指標としての標的細胞の生存は、トリパンブルー排除、 $^{51}\text{Cr}$ 放出、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン取り込み(タンパク合成)、 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み(DNA複製)を含む標準的なアッセイにより、3日にわたりインビトロでアッセイする。

抗B16-PA- $\alpha$  HLまたは抗B16-CIV- $\alpha$  HLなどの、 $\alpha$  HLに結合したB16特異的な抗体は、本発明の化合物を、DNP未処理のB16メラノーマ細胞表面に指向させるのに使える。本発明の化合物と共にインキュベーションした後の細胞の生存を、上記と同様にアッセイする。

#### 標的細胞の選択的透過性化

ある種の有核細胞は、細胞膜の損傷を修復できることが多く、赤血球のように容易には破壊されない可能性がある。しかし、本化合物の引き起こすこの限定された透過性化は、通常は細胞に取り込まれにくい薬剤の投与に有用である。例え

ば、化学療法剤メトトレキサートのアナログであるメトトレキサート- $\gamma$ -アスパラギン酸は、通常は細胞に取り込まれないため細胞毒性をもたないが、細胞内の細胞質に侵入すると、強力な細胞毒性を発揮する。標的細胞の選択的な透過性化は、この薬剤の腫瘍細胞への侵入の促進にも使える。このような治療法では、透過性を増した細胞だけに薬剤が取り込まれ、無傷の細胞には無毒のままなので、化学療法剤の副作用を最小限に抑えることができる。

別の例として、選択的な標的細胞の透過性化は、細胞内への毒性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入を起こすこともできる。通常は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は非常に低濃度( $0.05\text{-}0.2\mu\text{M}$ )に保たれ

ている。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  レベルは、約 4 オーダー高い(1.3mM)。細胞内の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  が持続的に増加すると、細胞は死滅する。そしてそれが発作における神経壊死や神経退化病の原因であると考えられている (Randall et al., J.Neurosci.12:1882-1895, 1992)。本発明の化合物は、標的細胞を透過性にし細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させることにより、特異的標的細胞を  $\text{Ca}^{2+}$  死させるのに使える。標的細胞の選択的透過性化はまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムのような、その他他の細胞毒性剤の取り込みを促進するのにも使える。

#### 実施例4：活性化され得る孔形成溶解剤のスクリーニング

細胞関連物質または条件により活性化されうる溶解孔形成剤を同定するための、新規スクリーニング法について以下に記載する。

##### 組み合わせ突然変異によるプロテアーゼ部位選択

組み合わせ突然変異に基づく新規スクリーニング法は、腫瘍から分泌されるプロテアーゼのペプチド配列特異性を決定するために、そして同時に、これらのプロテアーゼにより、より迅速に選択的に活性化されるような溶解孔形成剤を得るために発案された。これらの変異体は、同じ細胞に対する細胞毒性剤として使える(図11)。例えは、変異体  $\alpha$ -HLは、標的細胞抽出物により活性化されウサギ赤血球を溶解するようになる能力に基づいて、組合せライプラリーからスクリーニングされる。当業者によく知られた方法により作成される、ランダムな核酸配列を含む突然変異カセットは、孔形成剤をコードするプラスミドに組込むことができる。ある種の関連プロテアーゼの特異性の特徴は知られているので、遺伝子工学により作成した、突然変異カセットによりコードされたプロテアーゼ部位は、

これらの配列を基本とすることができるが、完全にランダムである必要はない。

例えは、組合せプラスミドライライブラリーからの候補クローンを、レブリカのニトロセルロースフィルターにまく。それからフィルター上の細菌コロニーを溶解し、組換えタンパクをフィルターに結合させる。一つのレブリカフィルターは、標的細胞抽出物と接触させ、コントロールとして、もう一枚のフィルターは未処理にする。両方のフィルターを血液寒天プレートにさらし、溶解ブラークの出現を計数する。または、フィルターを、細胞抽出物及び血液寒天に同時に接触させ

てもよい。細胞抽出物に接触させたフィルターを含むプレート上に溶血が現れ、未処理フィルターを含むプレート上には溶血が現れなければ、候補クローンが標的細胞抽出物中の物質により活性化される溶血分子を生産するをいうことを示している。活性化能の改良された変異体を同定するために、新たに同定された変異体について上記のような突然変異とスクリーニングを更に行うため、スクリーニングプロセスは繰り返される。

このようなコロニーの同定に続き、当業者に知られた方法に従ってプラスミドを細菌から精製し、変異体カセットのDNA配列決定解析をする。候補の孔形成化合物を、IVTTにより発現させ更に解析する。候補の孔形成化合物が、標的細胞により活性化されるかどうかは、標的細胞抽出物の存在化及び非存在化で、転写産物をインキュベートし、標的細胞を添加し、標的細胞の溶解をアッセイすることにより確認する。

#### 金属感受性変異体の選出

本発明スクリーニングアッセイとを使った同じような方法が、金属結合能を有する変異体の同定にも使える。上記のように、システインまたはヒスチジンコドンを基本としたオリゴヌクレオチドを使うことにより複雑性は限定されているので、スクリーンはセミランダムな突然変異カセットに基づく。上記のように、 $\alpha$  HLを発現している細菌コロニーからのタンパク質を金属イオン存在化及び非存在化でニトロセルロースフィルターに転写する。複製フィルターを血液寒天培地に接触させ、血液寒天培地の溶血の出現を計数する。このようにして、金属イオンが、溶血を阻止または活性化する能力を評価する。

その他の具体例は、次の請求の範囲に含まれる。

【図1】

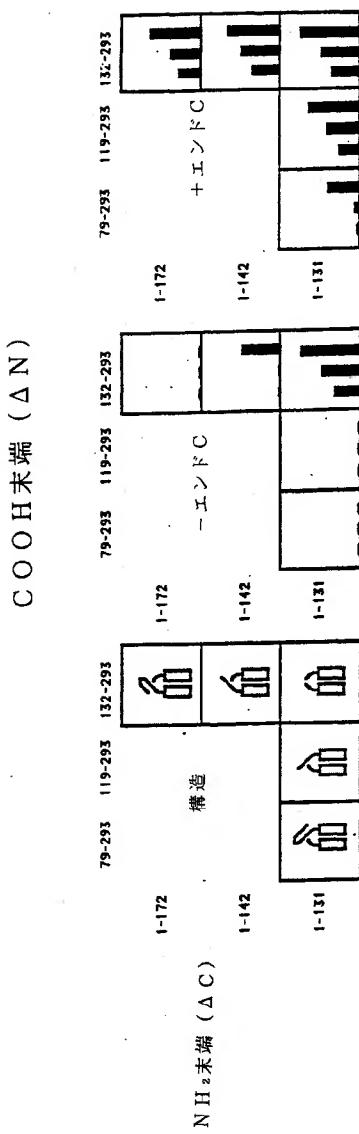


FIG. 1

【図2】

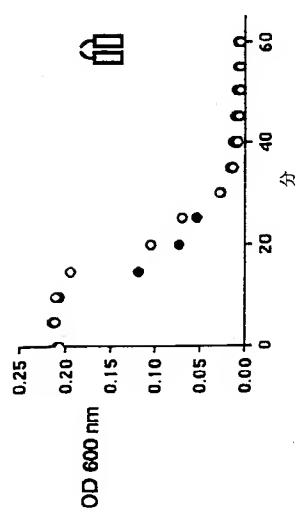


FIG. 2a

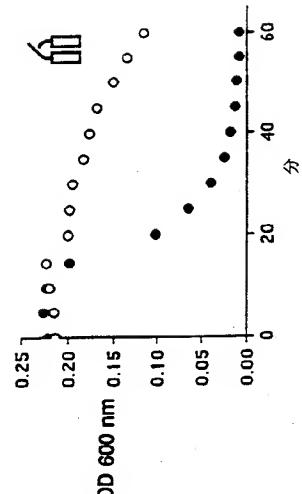


FIG. 2b

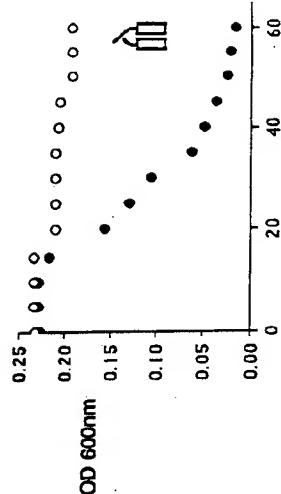


FIG. 2c

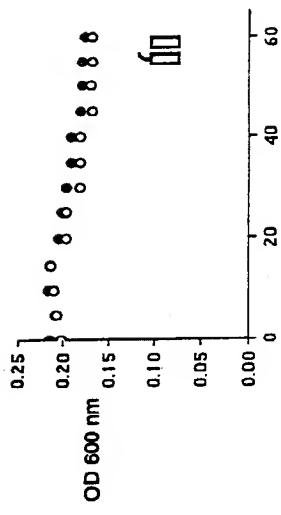


FIG. 2d

【図3】

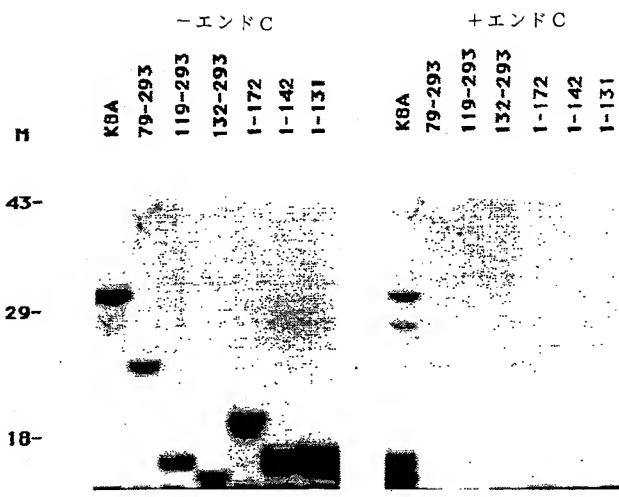


FIG. 3

【図4】

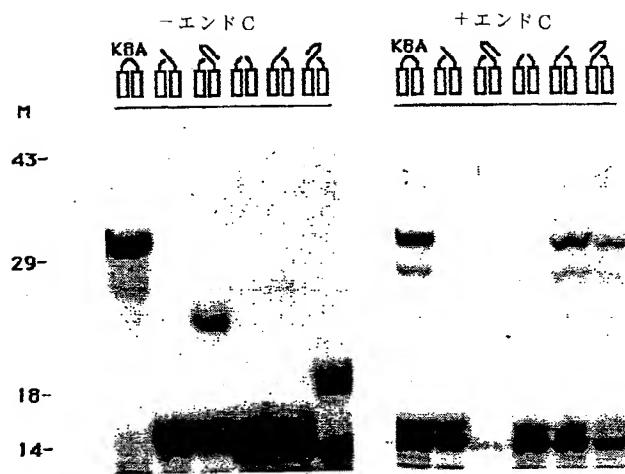


FIG. 4

【図5】

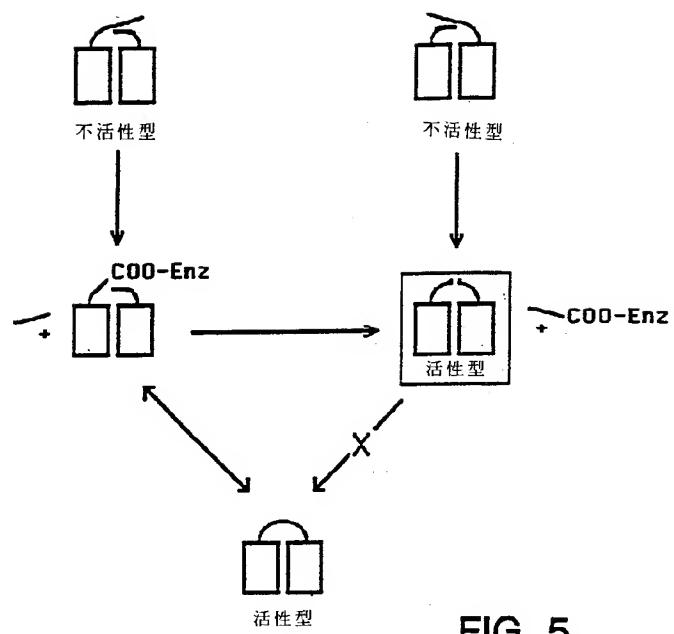


FIG. 5

(31)

特表平9-500102

【図6】

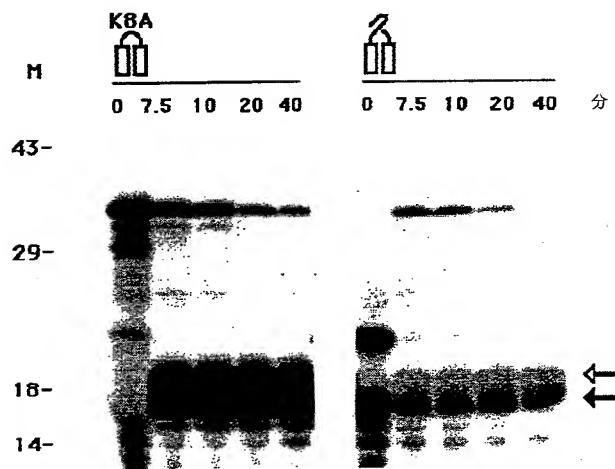
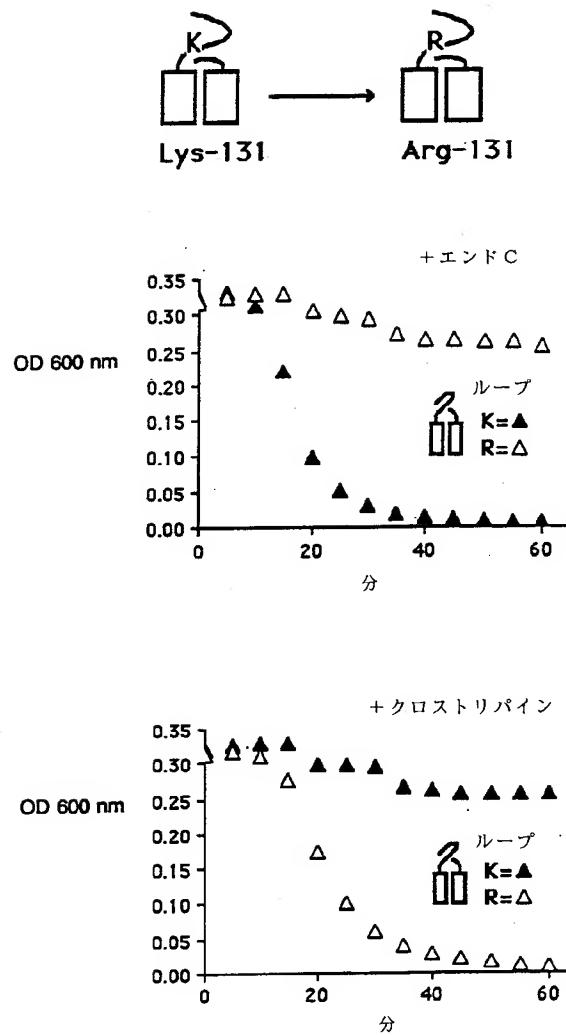


FIG. 6

【図7】

**FIG. 7**

【図8】

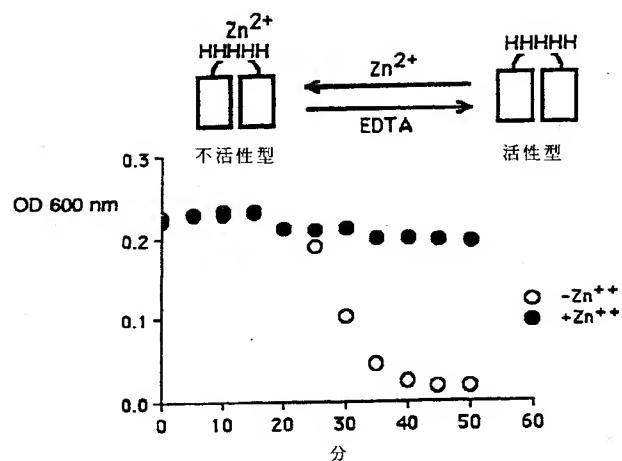


FIG. 8

【図9】

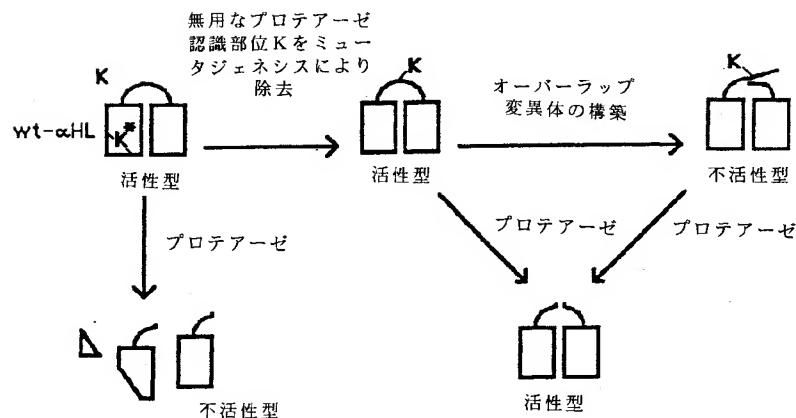


FIG. 9

【図10】

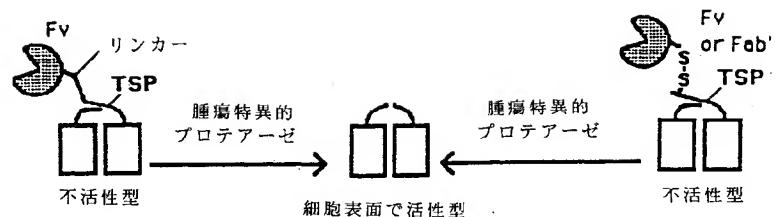
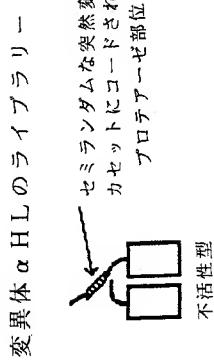


FIG. 10

【図11】

変異体 $\alpha$ -HLのライブリースクリーニング方法

一次スクリーニング：T<sup>+</sup>プロモーターを持つ單一  
プラスミドによる組み合せプラスミドライブリ  
ターからの候補クローンをニトロセルロースフィル  
ターに転写、腫瘍細胞抽出物で活性化、血液寒天で  
溶血活性をスクリーニング  
2次スクリーニング：候補プラスミドのIVTT、  
転写産物の標的細胞抽出物処理、標的細胞の添加、  
溶解アッセイ

FIG. 11

## 【国际调查报告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US94/04016
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(S) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet.		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,867,973 (GOERS ET AL.) 19 SEPTEMBER 1989, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-12
Y	US, A, 4,975,278 (SENTER ET AL.) 04 DECEMBER 1990, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-12
Y	BIOCHEMISTRY, VOL. 24, NO.8, ISSUED 1985, N. TOBKES ET AL., "SECONDARY STRUCTURE AND ASSEMBLY MECHANISM OF AN OLIGOMERIC CHANNEL PROTEIN, PAGES 1915-1919, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-12
Y	INFECTION AND IMMUNITY, VOL. 46, NO. 2, ISSUED NOVEMBER 1984, G.S. GRAY ET AL., "PRIMARY SEQUENCE OF THE ALPHA TOXIN GENE FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS WOOD 46", PAGES 615-618, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance; "E" earlier document published on or after the international filing date of the application which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reasons (as specified); "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means; "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.		
Date of the actual completion of the international search 09 JUNE 1994	Date of mailing of the international search report JUL 08 1994	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer CHRIS EISENSCHENK <i>R. Kugya for</i> Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US94/04016
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CELL, VOLUME 47, ISSUED 05 DECEMBER 1986, I. PASTAN ET AL., "IMMUNOTOXINS", PAGES 641-648, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-12
Y	CANCER RESEARCH, VOL. 51, ISSUED 15 JANUARY 1991, A. CHOVNICK ET AL., "A RECOMBINANT MEMBRANE- ACTING IMMUNOTOXIN", PAGES 465-467, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/US94/04016	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:</b> IPC (S): <b>C12P 21/00; A61K 35/14; C07K 15/28; C12Q 1/02</b>	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:</b> US CL : <b>435/4, 7.1, 7.2, 7.25, 69.7; 530/387.3; 424/65.8</b>	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched Classification System: U.S. <b>435/4, 7.1, 7.2, 7.25, 69.7; 530/387.3; 424/65.8</b>	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used): <b>APS, DIALOG, EMBASE, BIOSYS, LIFESCI, MEDLINE</b>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 0 7 K 14/31		8517-4H	C 0 7 K 14/315
		6807-4B	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/02		9637-4B	C 1 2 P 21/02
// C 1 2 P 21/02		8310-2J	G 0 1 N 33/566
G 0 1 N 33/566		9455-4C	A 6 1 K 37/02
			C
			A B B